

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(Translation)

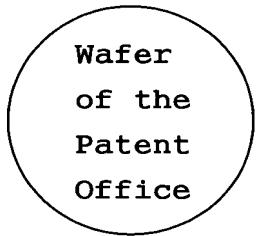
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application : November 30, 1999

Application Number : Patent Appln. No. 1999-340322

Applicant(s) : CanBas Co., Ltd.



April 8, 2004

Yasuo IMAI  
Commissioner,  
Patent Office

Seal of  
Commissioner  
of  
the Patent  
Office

Appln. Cert. No.

Appln. Cert. Pat. 2004-3028729

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

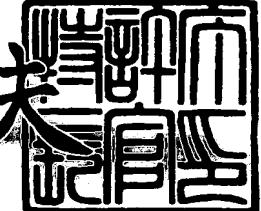
出願年月日      1999年11月30日  
Date of Application:

出願番号      平成11年特許願第340322号  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP1999-340322]

出願人      株式会社キャンバス  
Applicant(s):

2004年4月8日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫  


出証番号 出証特2004-3028729

【書類名】 特許願  
【整理番号】 NP99464-YS  
【提出日】 平成11年11月30日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 38/00  
【発明の名称】 抗癌療法の増強剤とそのスクリーニング方法  
【請求項の数】 13  
【発明者】  
【住所又は居所】 愛知県名古屋市瑞穂区密柑山町1-4 4-1  
コープ岡田305号  
【氏名】 河邊 拓己  
【発明者】  
【住所又は居所】 愛知県豊田市渋谷町1-1-16  
【氏名】 菅沼 正司  
【特許出願人】  
【識別番号】 396020800  
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団  
【代理人】  
【識別番号】 100093230  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 西澤 利夫  
【電話番号】 03-5454-7191  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 009911  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗癌療法の増強剤とそのスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するオリゴペプチド、G 2 期停止に関与するリン酸化酵素、および標識化リン供与体からなるリン酸化反応系に候補物質を添加し、オリゴペプチドのリン酸化を阻害する物質を選択することを特徴とする抗癌療法の細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質のスクリーニング方法。

【請求項 2】 リン酸化酵素が、hChk1、HuCds1/Chk2、またはこれら酵素と他の蛋白質との融合蛋白質、もしくはDNA傷害細胞の抽出液である請求項 1 のスクリーニング方法。

【請求項 3】 配列番号 1 における第 2 位および第 3 位XaaがGly、Leu、Ser またはArgであり、第 6 ~ 8 位XaaがGly、Leu、Ser、Met、ProまたはGluである請求項 1 のスクリーニング方法。

【請求項 4】 配列番号 1 における第 2 位XaaがGly、Leu、Ser またはArg、第 3 位XaaがGly、Leu またはSer、第 6 位XaaがGly、Met、ProまたはGlu、第 7 位XaaがGly、Leu またはPro、第 8 位XaaがGly、Met、Ser またはGluである請求項 3 のスクリーニング方法。

【請求項 5】 配列番号 1 における第 2 位XaaがArg、第 3 位XaaがSer、第 6 位XaaがMet、第 7 位XaaがPro、第 8 位XaaがGluである請求項 4 のスクリーニング方法。

【請求項 6】 リン酸化酵素が、hChk1、HuCds1/Chk2、またはこれら酵素と他の蛋白質との融合蛋白質である請求項 3 から 5 のいずれかのスクリーニング方法。

【請求項 7】 細胞周期 G 1 期チェックポイント機構に欠損を有する細胞に DNA傷害性処置を施し、この細胞の培地に候補物質を添加して培養した後、G 2 / M期に相当するDNA量の細胞集団が増加しない物質を選択することを特徴とする細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質のスクリーニング方法。

【請求項 8】 DNA傷害性処置を施した細胞における G 2 / M期に相当す

るDNA量の細胞集団を増加させず、かつ細胞周期M期停止を生じさせる薬剤処置によってG2/M期に相当するDNA量の細胞集団が増加する物質を選択する請求項7のスクリーニング方法。

【請求項9】 請求項1から8の方法によって選択された細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質。

【請求項10】 炭素、酸素および窒素からなる主鎖と、チロシン側鎖、プロリン側鎖およびアスパラギン側鎖を有する化合物である請求項9の細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質。

【請求項11】 配列番号2のアミノ酸配列を有するオリゴペプチドである請求項9の細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質。

【請求項12】 配列番号2における第2位および第3位XaaがGly、Leu、SerまたはArgであり、第5～8位XaaがSer、Gly、Met、ProまたはGluである請求項11の細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質。

【請求項13】 請求項9から12のいずれかの細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質またはその誘導体を有効成分とする抗癌処置増強剤。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

###### 【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質のスクリーニング方法と、この方法によって選択された細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質、並びにこの細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質を有効成分とする抗癌処置増強剤に関するものである。

##### 【0002】

###### 【従来の技術】

温熱療法や、放射線または紫外線等の照射、あるいは抗癌剤（例えば、ブレオマイシンやシスプラチン等）の投与など、多くの抗癌処置は癌細胞に対するDNA損傷を作用機序としている。しかしながら、これらの抗癌処置は、癌細胞も正常細胞も同様に傷害するため、癌患者はしばしば、激烈な副作用に見舞われる。また、この副作用のために、十分な抗癌治療が行えない場合が多い。

### 【0003】

一方、大半の正常ヒト細胞では、DNA傷害が起こった場合には、細胞周期G1期チェックポイントおよびG2期チェックポイントにおいて細胞周期を停止し、傷害を受けたDNAを修復するが、正常細胞における修復機能はG1期チェックポイントによる停止期に働くことが主であり、G2期チェックポイントの役割は少ないと考えられている。

### 【0004】

分子腫瘍学における最近の進歩によって、G1細胞周期チェックポイントが大半のヒト癌細胞で損なわれていることが明らかにされている。癌細胞の大部分は、G1期チェックポイントに関係するp53、Rb、p16<sup>INK4</sup>やp19<sup>ARF</sup>のような癌抑制遺伝子に突然変異や欠失を有するか、またはMDM-2やサイクリンDのような癌遺伝子が過剰発現している（参考文献1、2）。これらに加えて、増殖因子の過剰発現やこれら遺伝子、それらのレセプターまたは下流シグナル伝達分子の機能獲得突然変異によって引き起こされる過剰な増殖シグナルが、G1期チェックポイントを機能不全にすることによって細胞の形質転換を生じさせていると考えられる。例外的に、癌細胞のなかにはG1期チェックポイントではなくてG2期チェックポイントが破壊されているものもある（参考文献3）。このことは、正常な細胞周期においては、G2期チェックポイントと比較してG1期チェックポイントが相対的に重要であることを示している。突然変異の過剰集積はおそらく細胞に致命的であるが、上記のチェックポイントの破壊による突然変異率の上昇により最終的に発癌に至る突然変異を細胞に集積させる（参考文献4、5）。

### 【0005】

興味深いことに、G1期チェックポイントが損なわれている癌細胞においてもG2期チェックポイントは保持されている。正常細胞はG1とG2の2つの独立したDNA損傷チェックポイントを有しているので、何らかの処理によってG2期チェックポイントが選択的に破壊された場合、G1期チェックポイントが既に破壊されている癌細胞は、無傷のG1期チェックポイントを有する正常細胞よりもDNA損傷処理に対して一層敏感になるものと期待される。例えば、カフェイン等による非特異的なG2期チェックポイント破壊はp53欠失癌細胞をDNA損傷

に対して感受性にするのに有効であることが報告されている（参考文献6-7）。

### 【0006】

G2期チェックポイントに関する現在の仮説によれば、DNA損傷はrad3<sup>+</sup>/ATMの活性化によってプロテインキナーゼChk1およびHuCds1/Chk2を活性化する（参考文献11-14）。次いで、Chk1およびHuCds1/Chk2はヒトではCdc25Cの216番セリンをリン酸化し、そして14-3-3との結合を促進する（参考文献15-17）。分裂酵母では、14-3-3とCdc25Cとの結合によってCdc25Cは細胞質中に隔離され（参考文献18）、その結果Cdc25CによるCdc2/サイクリンBの活性化が阻害されるので、最終的にG2停止が誘導され、DNAの修復が行われる（参考文献19-21）。

### 【0007】

#### 【発明が解決しようとする課題】

前記のとおり、G1期チェックポイントが損なわれている癌細胞においては、さらにG2期チェックポイントが選択的に破壊されれば、抗癌剤等のDNA傷害処理に対して感受性となり、効果的な癌治療が可能となるものと期待される。また、そのような治療においては、G1およびG2の2つのチェックポイント機構を持たない癌細胞を対象とすることになるため、比較的少ない量の抗癌剤によっても癌細胞を死滅させることができ、正常細胞への副作用を大幅に低減することが可能となる。

### 【0008】

この出願は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、細胞周期のG2チェックポイント機構を選択的に破壊することのできる新規な物質をスクリーニングする方法と、この方法により選択された細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質を提供することを課題としている。

### 【0009】

また、この出願は、この細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質を有効成分とする抗癌処置増強剤を提供することを課題としてもいる。

### 【0010】

### 【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するものとして、以下の(1)～(13)の発明を提供する。

- (1) 配列番号1のアミノ酸配列を有するオリゴペプチド、G2期停止に関与するリン酸化酵素、および標識化リン供与体からなるリン酸化反応系に候補物質を添加し、オリゴスクレオチドのリン酸化を阻害する物質を選択することを特徴とする抗癌療法の細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質のスクリーニング方法。
- (2) リン酸化酵素が、hChk1、HuCds1/Chk2、またはこれら酵素と他の蛋白質との融合蛋白質、もしくはDNA傷害細胞の抽出液である前記発明(1)のスクリーニング方法。
- (3) 配列番号1における第2位および第3位XaaがGly、Leu、SerまたはArgであり、第6～8位XaaがGly、Leu、Ser、Met、ProまたはGluである前記発明(1)のスクリーニング方法。
- (4) 配列番号1における第2位XaaがGly、Leu、SerまたはArg、第3位XaaがGly、LeuまたはSer、第6位XaaがGly、Met、ProまたはGlu、第7位XaaがGly、LeuまたはPro、第8位XaaがGly、Met、SerまたはGluである前記発明(3)のスクリーニング方法。
- (5) 配列番号1における第2位XaaがArg、第3位XaaがSer、第6位XaaがMet、第7位XaaがPro、第8位XaaがGluである前記発明(4)のスクリーニング方法。
- (6) リン酸化酵素が、hChk1、HuCds1/Chk2、またはこれら酵素と他の蛋白質との融合蛋白質である前記発明(3)から(5)のいずれかのスクリーニング方法。
- (7) 細胞周期G1期チェックポイント機構に欠損を有する細胞にDNA傷害性処置を施し、この細胞の培地に候補物質を添加して培養した後、G2/M期に相当するDNA量の細胞集団が増加しない物質を選択することを特徴とする細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質のスクリーニング方法。
- (8) DNA傷害性処置を施した細胞におけるG2/M期に相当するDNA量の細胞集団を増加させず、かつ細胞周期M期停止を生じさせる薬剤処置によってG2/M期に相当するDNA量の細胞集団が増加する物質を選択する前記発明(7)

のスクリーニング方法。

(9) 前記発明(1)から(8)の方法によって選択された細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質。

(10) 炭素、酸素および窒素からなる主鎖と、チロシン側鎖、プロリン側鎖およびアスパラギン側鎖を有する化合物である前記発明(9)の細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質。

(11) 配列番号2のアミノ酸配列を有するオリゴペプチドである前記発明(9)の細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質。

(12) 配列番号2における第2位および第3位XaaがGly、Leu、SerまたはArgであり、第5～8位XaaがSer、Gly、Met、ProまたはGluである前記発明(11)の細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質。

(13) 前記発明(9)から(12)のいずれかの細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質またはその誘導体を有効成分とする抗癌処置増強剤。

#### 【0011】

以下、これらの発明の実施形態について詳しく説明する。

#### 【0012】

##### 【発明の実施の形態】

この出願の発明(1)のスクリーニング方法は、例えば以下のとおりに実施することができる。

#### 【0013】

基質（配列番号1のアミノ酸配列を有するオリゴペプチド）、G2期停止に関するリン酸化酵素、標識化リン供与体からなるin vitroリン酸化反応系に候補物質を添加し、基質のリン酸化を阻害する物質を選択する。このようにして選択された物質は、リン酸化酵素の活性を阻害することによって基質のリン酸化を阻害する物質であるため、細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質として特定することができる。

#### 【0014】

標識化リン供与体としては、例えば、実施例に示したような、放射性同位元素[32]Pで標識したγ-ATP等を用いることができる。また、細胞のG2期停止

に関するリン酸化酵素としては、ヒト由来のリン酸化酵素hChk1またはHuCds1/Chk2の全長を用いることができる。また、これら酵素と他の蛋白質（例えばGSTやMBP等）との融合蛋白質を用いることができる。さらには、抗癌剤等のDNA傷害性処置によって刺激した細胞の抽出液を用いることもできる（以上、発明(2)）。

#### 【0015】

基質としてのオリゴペプチドは、具体的には、配列番号1における第2位および第3位XaaがGly、Leu、SerまたはArgであり、第6～8位XaaがGly、Leu、Ser、Met、ProまたはGluであるオリゴペプチド（発明(3)）である。さらに具体的には、配列番号1における第2位および第3位XaaがGly、Leu、SerまたはArgであり、第6～8位XaaがGly、Leu、Ser、Met、ProまたはGluであるオリゴペプチド（発明(4)）であり、最も具体的には、配列番号1における第2位XaaがArg、第3位XaaがSer、第6位XaaがMet、第7位XaaがPro、第8位XaaがGluであるオリゴペプチド（発明(5)：配列番号3）である。

#### 【0016】

この出願の前記発明(7)のスクリーニング方法は、例えば以下のとおりに実施することができる。

先ず、ヒト白血病細胞株Jurkat等の細胞周期G1期チェックポイント機構に欠損を有する細胞にDNA傷害性処置を施す。このDNA傷害性の処置としては、細胞の培地にブレオマイシン等の抗癌剤を添加したり、あるいは細胞に放射線を照射するなどの処置を例示することができる。そして、この細胞の培養培地に候補物質を添加し、10～48時間程度培養した後、細胞のDNA量を測定する。例えば、培養上澄を捨て、ヨウ化プロピジウムおよびNP-40等の界面活性剤溶液に細胞を浮遊させ、フローサイトメーターを用いて細胞のDNA量を測定することができる。このDNA量が、コントロール細胞のG2/M期と同等に増加している場合には、培地に添加した候補薬剤がG2期チェックポイント機構を破壊していないと判定する。一方、コントロール細胞のG2/M期と同等にDNA量を増加させない物質は、G2期チェックポイント機構破壊物質として特定される。

#### 【0017】

さらにこの出願の発明(8)のスクリーニング方法では、前記発明(7)の方法において選択された物質であって、かつ、細胞周期M期停止を生じさせる薬剤処置によって細胞のDNA量が増加する物質を選択する。すなわち、コルヒチン等のM期停止を生じさせる薬剤で細胞を処理して細胞周期をM期に停止させ、この細胞の培養培地に前記発明(7)で選択した物質を添加する。このとき、G2/M期と同等にDNA量を増加させる物質はM期での停止には影響を及ぼさず、G2期チェックポイント機構のみを選択的に破壊する物質として特定される。

#### 【0018】

この出願の発明(9)は、以上のとおりの発明(1)～(8)のスクリーニング方法によって選択された細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質である。このような物質としては、炭素、酸素および窒素からなる主鎖と、チロシン側鎖およびプロリン側鎖を有する化合物（発明(10)）を例示することができる。例えば、図1Bに構造を例示した化合物である。

#### 【0019】

さらに、細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質としては、配列番号2のアミノ酸配列を有するオリゴペプチド（発明(11)）を例示することもできる。このようなオリゴペプチドは、例えば、配列番号2における第2位および第3位XaaがGly、Leu、SerまたはArgであり、第5～8位XaaがSer、Gly、Met、ProまたはGluであるオリゴペプチド（発明(12)）であり、具体的には図1Aに構造を示した合成ペプチドである。このようなオリゴペプチドは、公知の固相ペプチド合成法等により調製することができる。

#### 【0020】

発明(13)は、前記発明(9)～(12)の細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質を有効成分とする抗癌処置の増強剤である。この薬剤を癌組織に投与し、癌細胞のG2期チェックポイントを破壊すると同時に、抗癌剤投与等の抗癌処を行うことによって癌細胞を死滅させる癌治療方法に用いることができる。すなわち、前記のG2期チェックポイント機構破壊物質は、G2期停止に関するリン酸化酵素hChk1およびHuCds1/Chk2の活性を抑制するため、既にG1期チェックポイント機能を喪失している癌細胞は、G2期に停止してDNA修復を行うこ

とができず、抗癌剤等の処置をより有効に作用させることができる。この増強剤は、例えば、その有効成分であるG2期チェックポイント機構破壊物質を適当な溶液担体に溶解するか若しくは分散させ、または適当な粉末担体と混合するかこれに吸着させるなどして製剤化することができる。

#### 【0021】

以下、実施例を示してこの出願の前記発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

#### 【0022】

##### 【実施例】

###### 実施例1

オリゴペプチドYPN（配列番号4）、AAA（配列番号5）および4aa（配列番号6）を公知の固相ペプチド合成法により作製した。

#### 【0023】

$8 \times 10^5$ 個のJurkat細胞を、10%牛胎児血清含有のRPMI1640培地で、37°C、5%CO<sub>2</sub>で培養した。この培地に、さらに10μg/mlのブレオマイシンと、20μg/mlのオリゴペプチドYPN、AAAまたは4aaを加え、0、6、12、24時間後にDNA量を定量した。DNAの定量は、ヨウ化プロピジウムおよびNP-40含有の緩衝液に細胞を浮遊し、フローサイトメーターにより行った。

#### 【0024】

結果は図2に示したとおりである。この図2の左側はフローサイトメーターの測定結果であり、右側はDNA量毎の細胞の割合を示すグラフである。

この図2の結果から明らかなように、オリゴペプチドYPNを培地に添加した細胞がG2/M期におけるDNA量を増加させていないことが判明した。

#### 【0025】

さらに、ブレオマイシンの代わりにコルヒチンを用いて同様に各細胞周期のDNA量を定量した。結果は図3に示したとおりであり、ブレオマイシン処置ではDNA量が増加しなかったオリゴペプチドYPNも、他のオリゴペプチドと同様にコルヒチン処理ではDNA量を増加させた。

#### 【0026】

以上の結果から、オリゴペプチドYPNは、細胞周期G2期チェックポイント機構を特異的に破壊する物質であることが確認された。

### 実施例2

配列番号7のアミノ酸配列からなる合成ペプチドを基質、組換えhChk1およびHuCds1/Chk2をリン酸化酵素とし、放射性同位元素[32]Pでラベルした $\gamma$ -ATPを用いてリン酸化反応系に、オリゴペプチドTAT-S216A（配列番号8）を加えて反応阻害を検出した。反応は、30°Cで15分間行い、その後15%SDS-PAGE法にて各ペプチドを分離し、オートラジオグラフィーにより反応阻害の程度を検出した。

#### 【0027】

結果は図4に示したとおりであり、TAT-S216Aは、組換えhChk1およびHuCds1/Chk2による合成ペプチド（配列番号7）のリン酸化反応を阻害した。

以上の結果から、オリゴペプチドTAT-S216Aは細胞周期G2期チェックポイント機構を特異的に破壊する物質であることが確認された。

#### 【0028】

なお、TAT-S216Aは、この出願の発明者らによる先願発明（特願平11-269398号）の一つである。

### 実施例3

TAT配列（配列番号4-6、8および9のN端11アミノ酸配列）に、表1に示した様々なアミノ酸配列を連結してオリゴペプチドを合成し、培養細胞におけるG2期チェックポイント機構の破壊効果（実施例1と同様の方法）、hChk1およびHuCds1/Chk2による基質ペプチド（配列番号7）のリン酸化反応阻害効果、および各オリゴペプチドのリン酸化の程度を試験した。

#### 【0029】

結果は表1に示したとおりである。

#### 【0030】

#### 【表1】

オリゴペプチド配列	DNA傷害後 G2チェックポイント阻害										hChk1またはHuCds1/Chk2による インビトロ磷酸化阻害		hChk1またはHuCds1/Chk2による 自身の磷酸化	
	DNA傷害後 G2チェックポイント阻害					hChk1またはHuCds1/Chk2による インビトロ磷酸化阻害					hChk1またはHuCds1/Chk2による 自身の磷酸化		hChk1またはHuCds1/Chk2による 自身の磷酸化	
	A	R	S	T	M	P	E	A	L	-	+	+	N.D.	N.D.
1 YGRKKRRQRRR L	A	R	S	A	S	M	P	E	A	-	++	+	-	-
2 YGRKKRRQRRR Y	Y	C	G	P	G	G	G	N	L	-	+	+	N.D.	N.D.
3 YGRKKRRQRRR Y	Y	L	S	R	S	P	P	M	N	-	+	+	N.D.	N.D.
4 YGRKKRRQRRR R	Y	S	L	P	P	E	L	S	N	-	++	+	-	-
5 YGRKKRRQRRR L	Y	R	S	P	A	M	P	E	N	-	++	+	-	-
6 YGRKKRRQRRR L	Y	R	S	P	S	M	P	E	N	-	++	+	-	-
7 YGRKKRRQRRR G	G	R	S	P	A	M	P	E	-	-	-	-	N.D.	N.D.
8 YGRKKRRQRRR G	G	G	S	P	A	M	P	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.
9 YGRKKRRQRRR G	G	R	S	P	S	M	P	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.
10 YGRKKRRQRRR G	G	S	P	S	S	M	P	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.
11 YGRKKRRQRRR G	G	S	P	A	M	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.
12 YGRKKRRQRRR G	G	S	P	S	M	-	-	-	-	-	-	-	N.D.	N.D.

**【0031】****実施例3**

ヒト胃癌細胞株CO-4をヌードマウス皮下に接種し、その生着を確認した後、抗癌剤CDDP (1.5 mg/kg) または5-FU (20 mg/kg) を腹腔内に投与するとともに、オリゴペプチドTAT-S216 (配列番号9) 20 mg/kgを0.5 μlを週3回または5回、腫瘍に局所注射し、腫瘍を切除し、重量を測定した。

**【0032】**

結果は図5に示したとおりであり、オリゴペプチドTAT-S216 (特願平11-269398号) を週3回投与した場合には、腫瘍重量が有意に減少し、抗癌剤CDDP (図5上段) および5-FU (図5下段) の効果が増強されることが確認された。

**【0033】****【発明の効果】**

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、DNA傷害処理による癌細胞のG2期チェックポイント機構を特異的に破壊することのできる物質と、この物質を確実にスクリーニングすることのできる方法が提供される。このG2期チェックポイント機構破壊物質の処理によって癌細胞は抗癌剤等の抗癌処理に対して感受性となるため、癌治療をより効果的に行うことが可能となる。

**【0034】****【配列表】**

<110> 科学技術振興事業団 (Japan Science and Technology Corporation)

<120> 抗癌療法の増強剤とそのスクリーニング方法

<130> N P 9 9 4 6 4 - Y S

<160> 9

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized oopeptide

<400> 1

Tyr Xaa Xaa Pro Ser Xaa Xaa Xaa Asn

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide

<400> 2

Tyr Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Asn

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide

<400> 3

Tyr Arg Ser Pro Ser Met Pro Glu Asn

1 5

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide

<400> 4

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Tyr Gly Gly Pro Gly

1

5

10

15

Gly Gly Gly Asn

20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthesized peptide

&lt;400&gt; 5

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Ala Arg Ser Ala

1

5

10

15

Ser Met Pro Glu Ala Leu

20

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthesized peptide

&lt;400&gt; 6

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Ser Pro Ala

1

5

10

15

Met Pro

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Synthesized peptide

<400> 7

Leu Tyr Arg Ser Pro Ser Met Pro Glu Asn Leu

1 5 10

<210> 8

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide

<400> 8

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Tyr Arg Ser Pro

1 5 10 15

Ala Met Pro Glu Ala Leu

20

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide

<400> 9

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Tyr Arg Ser Pro

1 5 10 15

Ser Met Pro Glu Ala Leu

20

【0035】

【参考文献】

1. Levine, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division

- on. Cell 88, 323-331 (1997).
2. Larsen, C.J. Contribution of the dual coding capacity of the p16INK4a/MTS1/CDKN2 locus to human malignancies. Prog. Cell. Cycle. Res 3, 109-124 (1997).
  3. Kawabe, T., Muslin, A.J. & Korsmeyer, S.J. Hox11 interacts with protein phosphatases PP2A and PP1 and disrupts a G2/M cell-cycle checkpoint. Nature 385, 454-458 (1997).
  4. Hartwell, L.H. & Kastan, M.B. Cell cycle control and cancer. Science 266, 1821-1828 (1994).
  5. Paulovich, A.G., Toczyski, D.P. & Hartwell, L.H. When checkpoints fail. Cell 88, 315-321 (1997).
  6. Rowley, R. Reduction of radiation-induced G2 arrest by caffeine. Rad. Res 129, 224-227 (1992).
  7. Yao, S.L. et al. Selective radiosensitization of p53-deficient cells by caffeine-mediated activation of p34cdc2 kinase. Nature Med 2, 1140-1143 (1996).
  8. DeFrank, J.S., Tang, W. & Powell, S.N. p53-null cells are more sensitive to ultraviolet light only in the presence of caffeine. Cancer Res 56, 5365-5368 (1996).
  9. Wang, S.W., Norbury, C., Harris, A.L., Toda, T. Caffeine can override the S-M checkpoint in fission yeast. J. Cell Sci. 112, 927-937 (1999).
  10. Wang, Q., Fan, S., Eastman, A., Worland, R.J., Sausville, E.A. & O'Connor, R.M. UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. J. Natl. Cancer. Inst 88, 956-965 (1996).
  11. Walworth, N., Davey, S., Beach, D. Fission yeast chk1 protein kinase links the Rad checkpoint pathway to cdc2. Nature 363, 368-371 (1993).

12. Walworth, N.C., Bernards, R. rad-dependent-response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science* 271, 353-356 (1996).
13. Matsuoka, S., Huang, M., Elledge, S.J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282, 1893-1897 (1998).
14. Zeng, Y. et al. Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature* 395, 507-510 (1998).
15. Furnari, B., Rhind, N., Russell, P. Cdc25C mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* 277, 1495-1497 (1997).
16. Sanchez, Y. et al. Conservation of the chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to cdk regulation through cdc25. *Science* 277, 1497-1501 (1997).
17. Peng, C.Y. et al. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of cdc25C on serine-216. *Science* 277, 1501-1505 (1997).
18. Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O., Russel, P. Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* 397, 172-175 (1999).
19. Nurse, P. Checkpoint pathways come of age. *Cell* 91, 865-867 (1997).
20. Weinert, T.A. DNA damage checkpoint meets the cell cycle engine. *Science* 277, 1450-1451 (1997).
21. Russell, P. Checkpoints on the road to mitosis. *TIBS* 23, 399-402 (1998).

**【図面の簡単な説明】****【図1】**

この発明のオリゴペプチド（A）と、化合物（B）の構造である。

【図2】

この発明のオリゴペプチドとブレオマイシンとを培地に加えて培養したJurkat細胞のDNA量に関するフローサイトメーターの測定結果（左）と、DNA量毎の細胞の割合を示すグラフ（右）である。

【図3】

図2の測定におけるブレオマイシンの代わりにコルヒチンを用いて同様に各細胞周期のDNA量を定量したフローサイトメーターの測定結果である。

【図4】

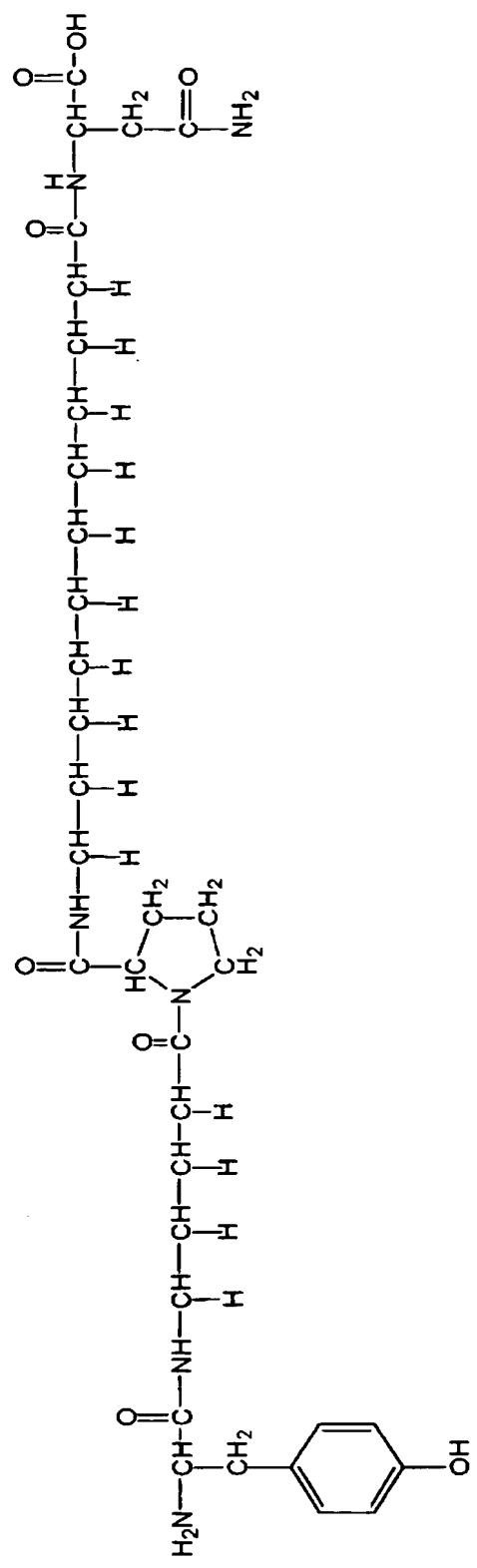
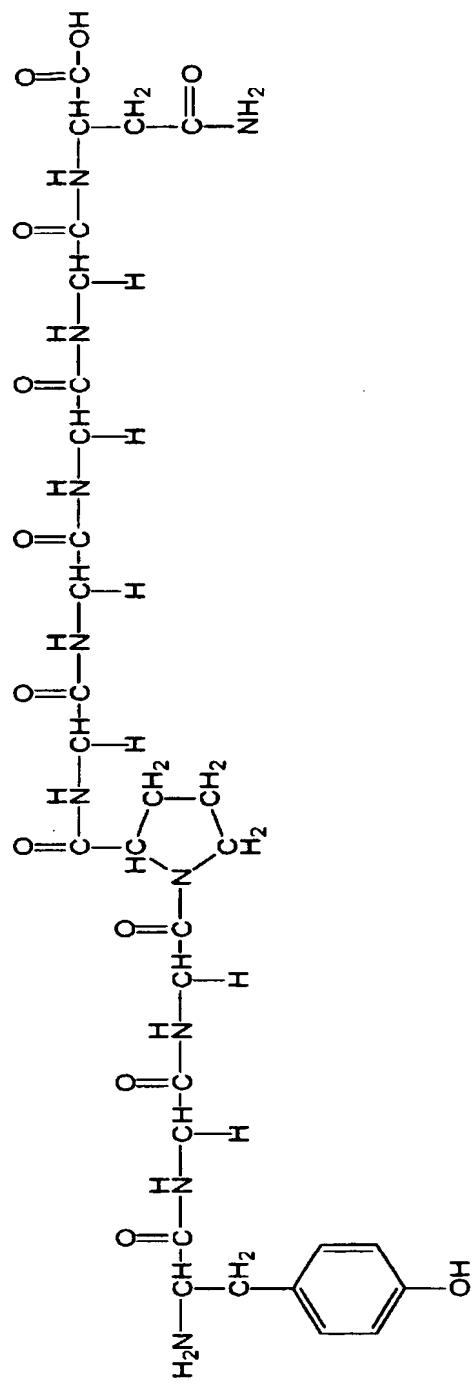
TAT-S216AのChk1およびChk2/HcCds1活性阻害の実験結果を示すプロッティング図である。基質となる合成ペプチド（ $10\ \mu M$ ）の4倍量のTAT-S216A（ $40\ \mu M$ ）にてChk1およびChk2/HcCds1の活性が阻害された。

【図5】

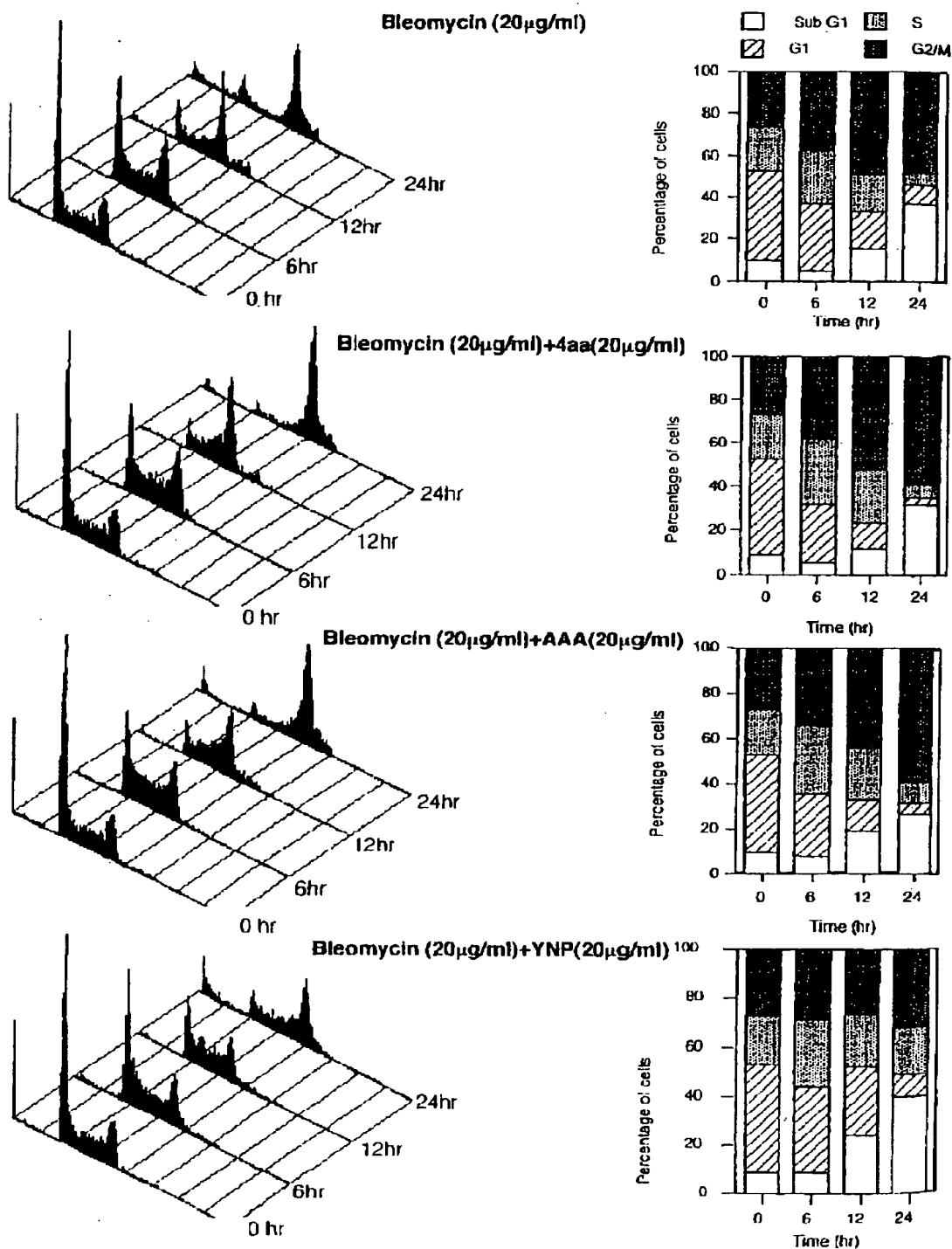
ヒト胃癌細胞株CO-4を皮下接種したヌードマウスに、抗癌剤CDDPまたは5-FUの腹腔内投与とともに、オリゴペプチドTAT-S216を週3回または5回、腫瘍に局所注射した場合の腫瘍重量を示すグラフである。

【書類名】 図面

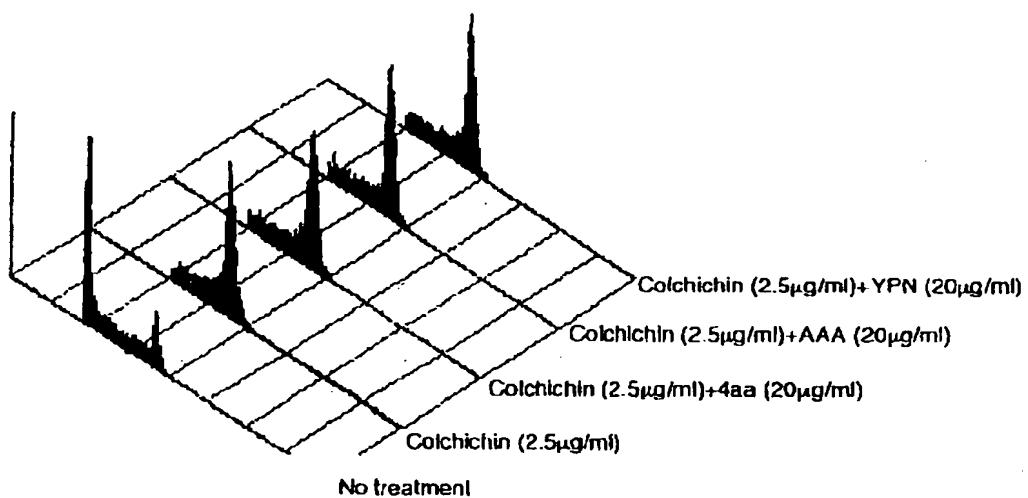
【図1】



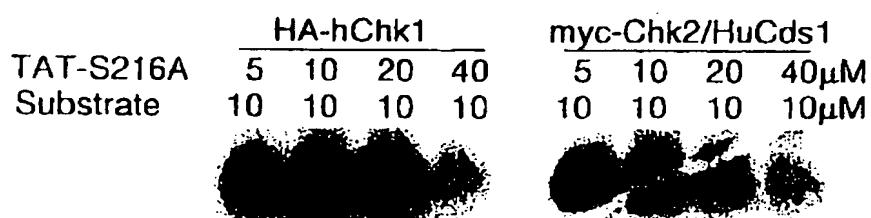
【図2】



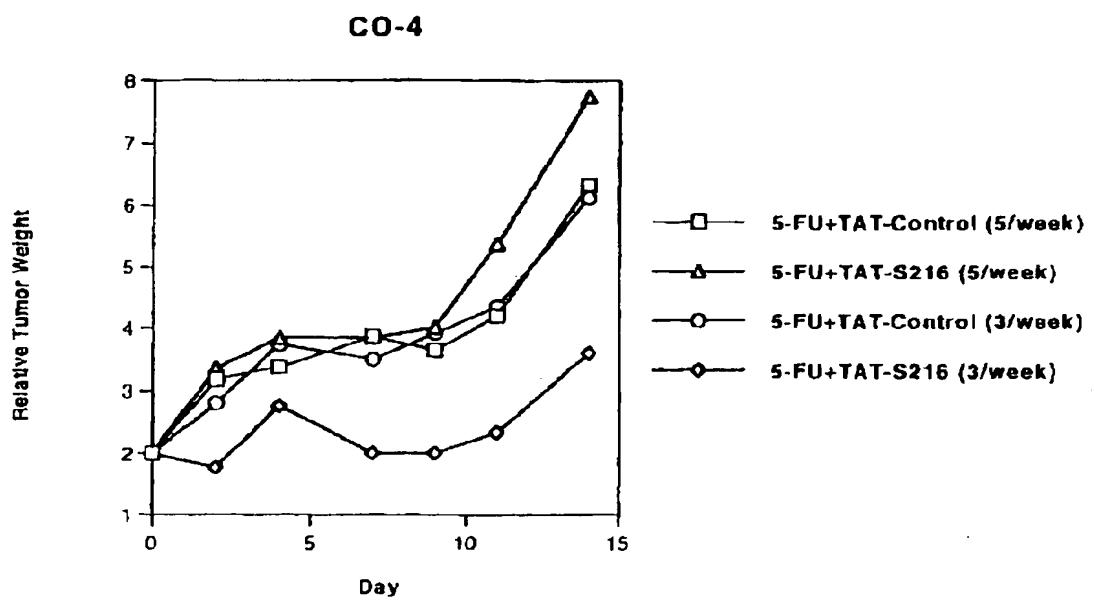
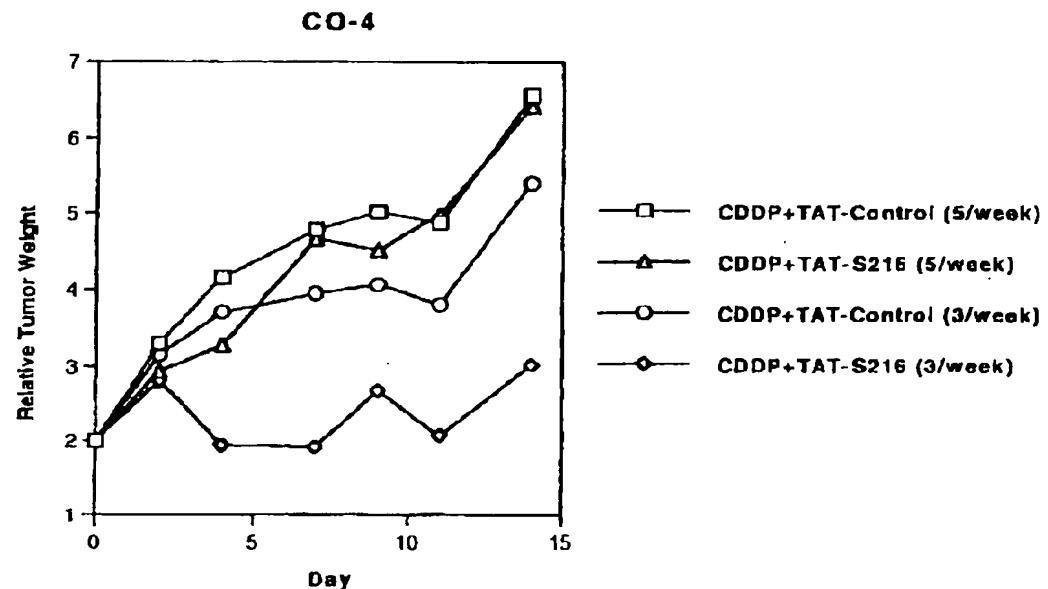
【図3】



【図4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 D N A 傷害処理による癌細胞のG 2期チェックポイント機構を特異的に破壊する物質をスクリーニングする方法と、この方法により選択された細胞周期G 2期チェックポイント機構破壊物質を提供する。

【解決手段】 配列番号1のアミノ酸配列を有するオリゴペプチド、G 2期停止に関与するリン酸化酵素、および標識化リン供与体からなるリン酸化反応系に候補物質を添加し、オリゴヌクレオチドのリン酸化を阻害する物質を選択する方法、または細胞周期G 1期チェックポイント機構に欠損を有する細胞にD N A傷害性処置を施し、この細胞の培地に候補物質を添加して培養した後、細胞のD N A量が増加しない物質を選択することを特徴とする方法、並びにこれらの方によって選択された細胞周期G 2期チェックポイント機構破壊物質。

【選択図】 図1

【書類名】 出願人名義変更届

【提出日】 平成12年 9月19日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第340322号

【承継人】

【住所又は居所】 愛知県豊田市渋谷町1-1-16

【氏名又は名称】 株式会社キャンバス

【承継人代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 4,200円

【提出物件の目録】

【物件名】 謙渡証書 2

【物件名】 委任状 1

(E)20001820067  


## 譲渡証書

平成12年8月28日

住所 愛知県名古屋市瑞穂区密柑山町1-44-1 コーポ岡田305号  
譲受人 河邊拓己 

住所 愛知県豊田市渋谷町1-1-16  
譲受人 菅沼正司 

住所 埼玉県川口市本町四丁目1番8号  
譲渡人 科学技術振興事業団

理事長 川崎雅弘 

下記の特許出願に係る特許を受ける権利の全部を貴殿に譲渡したことに相違ありません。

## 記

## 1. 特許出願の番号

特願平11-340322号

## 2. 発明の名称

抗癌療法の増強剤とそのスクリーニング方法

## 譲渡書

平成12年8月28日

### 譲受人

住 所 愛知県豊田市渋谷町1-1-16  
名 称 株式会社キャンバス  
代表者 菅沼 正司 殿

### 譲渡人

住 所 愛知県名古屋市瑞穂区蜜柑山町1-44-1  
コープ岡田305号  
氏 名 河邊拓己   
住 所 愛知県豊田市渋谷町1-1-16  
氏 名 菅沼正司 

下記の発明につきまして、私の特許を受ける権利の全てを貴殿に譲渡いたします。

(記)

特許出願番号

平成11年特許願第340322号

(B)20001820067



## 委任状

平成12年8月28日

私は、

識別番号100093230（弁理士）西澤利夫氏

を以て代理人として下記事項を委任します。

1. 平成11年特許願第340322号に関する手続
1. 上記出願又は平成 年 願 第 号に基づく  
特許法第41条第1項又は実用新案法第8条第1項の規定による優先権の主張  
及びその取下げ
1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求
1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続（権利維持の管理について  
は除く）並びにこれらの権利の放棄
1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護標章）登録  
に関する登録異議の申立てに関する手続
1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、  
防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関する  
手続
1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求
1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続
1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、自請の取下げ又は申立ての取下げ
1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住所 愛知県豊田市渋谷町1-1-16

名称 株式会社キヤンバス

代表者 肖沼 正司



**認定・付加情報**

特許出願の番号	平成11年 特許願 第340322号
受付番号	20001820067
書類名	出願人名義変更届
担当官	小菅 博 2143
作成日	平成12年11月15日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【提出された物件の記事】

【提出物件名】	委任状（代理権を証明する書面）	1
	譲渡証書	1

次頁無

特願平11-340322

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団

特願平11-340322

出願人履歴情報

識別番号 [500495636]

1. 変更年月日 2000年 9月19日

[変更理由] 新規登録

住所 愛知県豊田市渋谷町1-1-16  
氏名 株式会社キャンバス